

氏 名	まちだ たかし 町田 崇		
学 位 の 種 類	博士（薬学）		
報 告 番 号	乙第 1636 号		
学位授与の日付	平成 28 年 9 月 27 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当（論文博士）		
学 位 論 文 題 目	Involvement of the thrombin-activated pericytes in the blood-brain barrier dysfunction （トロンビン反応性脳ペリサイトによる血液脳関門障害）		
論 文 審 査 委 員	（主 査）	福岡大学	教授 片岡 泰文
	（副 査）	福岡大学	教授 岩崎 克典
		福岡大学	教授 三島 健一
		福岡大学	准教授 道具 伸也

## 内 容 の 要 旨

### 【緒言・目的】

血液脳関門（blood-brain barrier:BBB）は、脳血管内皮細胞、アストロサイト及び脳ペリサイトによって構成される高度に分化した機構である。BBB の実体はタイトジャンクションタンパク質（tight junction proteins: TJs）と細胞膜に存在する種々のトランスポーターであり、これらの働きにより末梢血中と脳との物質交換が厳密に制御され脳の恒常性が維持されている。従って、BBB は末梢と中枢神経を繋ぐインターフェイスとしての役割を担う重要な「器官」として位置づけることができる。

BBB は、健常状態においては非常に強固かつ密着した構造体であるが、脳炎症時には TJs は障害され脆弱となる。脳炎症は、脳卒中やアルツハイマー病、パーキンソン病やさらには末梢性慢性炎症病態である糖尿病時の合併症としても認められる。これらの病態では BBB 障害により、通常末梢からの流入を制限されている生体内物質や炎症性物質、炎症性細胞などが流入し、中枢神経が障害される。例えば、軽度認知機能障害の患者では、中枢神経障害に先行して BBB 障害が生じている。つまり、BBB 障害は、末梢性慢性炎症が中枢へ伝播される際の基盤となる病態であると考えられる。

我々は脳ペリサイトが、他の BBB 構成細胞と比較して、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  に高い反応性を示し、種々の炎症性サイトカインやケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase-9: MMP-9）等を産生することを報告した。MMP-9 は、生理的状态及び病的状態において細胞外基質を分解する亜鉛依存性のエンドペプチダーゼである。MMP-9 は脳卒中やアルツハイマー病、糖尿病性認知機能障害などの脳障害時に脳内で検出され、これらの病態時の BBB 破綻に関与する。すなわち、MMP-9 は BBB 障害に対する重要なメディエーターであり、高い MMP-9 産生能を持つ脳ペリサイトは、中枢神経障害に関与する着目すべき重要な細胞であると考えられる。

脳卒中やアルツハイマー病、糖尿病時の末梢血中に増加する因子の一つであるトロンビンは、凝固因子としての作用に加え、近年においては種々の炎症病態に関与する炎症性メディエーターとしても知られる。そこで、我々は末梢炎症の中枢伝播に関与する物質とし

てトロンビンに着目し、脳ペリサイトがその際の BBB 障害に中心的な役割を果たすと仮定した。本研究は、末梢性慢性炎症病態時の BBB 障害へのトロンビン反応性脳ペリサイトの関与についての検討を目的とするものである。

## 【結果】

### 2-1 耐糖能異常モデルマウスの脳内トロンビン量の変化と、トロンビン反応性脳ペリサイトの BBB 障害に対する作用

#### 2-1-1 肥満・耐糖能異常モデルマウスの組織及び血漿中トロンビン濃度の測定

肥満・耐糖能異常モデルマウス及びコントロールマウスから脳、血漿をそれぞれ採取し、ELISA 法にてトロンビン濃度を測定した。High fat diet (HFD) 2 週間処理のモデルマウスでは血漿中でのみトロンビン濃度の有意な上昇がみられた (Fig. 1A, 1B)。一方、HFD8 週間処理モデルマウスでは、脳及び血漿でトロンビン濃度の有意な上昇がみられた (Fig. 1C, 1D)。

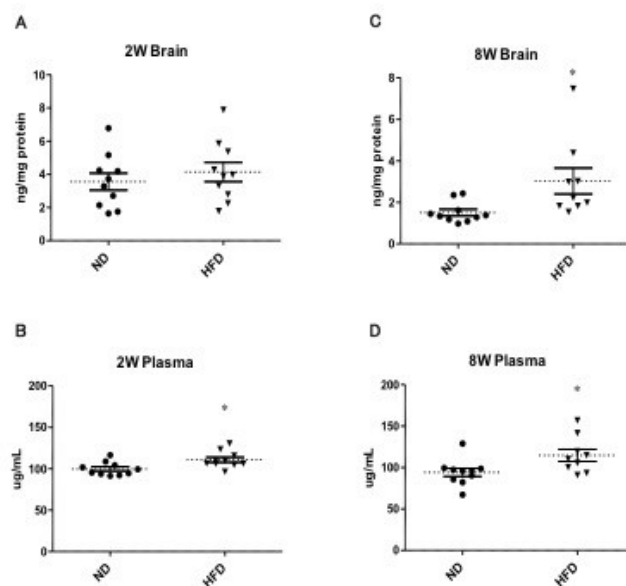


Figure 1. Prothrombin/thrombin levels in brain (A, C) and plasma (B, D) of mice fed ND or HFD for two (2W) or eight (8W) weeks. Measured using ELISA. Circles represent individual ND mice and triangles HFD mice. Dotted lines represent means and solid lines SEMs (n=9-10). \*p<0.05 vs ND-fed mice.

#### 2-1-2 in vitro BBB モデルを用いた経内皮細胞透過性及び脳血管内皮細胞細胞障害の評価

In vitro BBB モデルを用いて、トロンビンで処理された脳ペリサイトが BBB のバリア機能に与える影響を調べた。トロンビンを abluminal chamber に負荷すると、co-culture でのみトロンビンは経内皮細胞透過性を濃度依存的に亢進させた (Fig. 2A)。monolayer、co-culture とともに、脳血管内皮細胞の細胞障害は認められなかった (Fig. 2C)。また、トロンビンの luminal chamber への処理では、monolayer、co-culture のいずれにおいても経内皮細胞透過性の亢進はみられなかった (Fig. 2B)。

### 2-2 脳ペリサイトのトロンビン誘発性 MMP-9 産生・放出能の検討

トロンビン処理による MMP-9 産生・放出について BBB 構成細胞間において比較を行ったところ、脳血管内皮細胞、アストロサイトと比較して脳ペリサイトにおいて著しい MMP-9 の産生・放出が認められた (Fig. 3A-3D)。また、この MMP-9 産生・放出は、PAR1 阻害剤の SCH79797 により一部抑制された (Fig. 3E, 3F)。

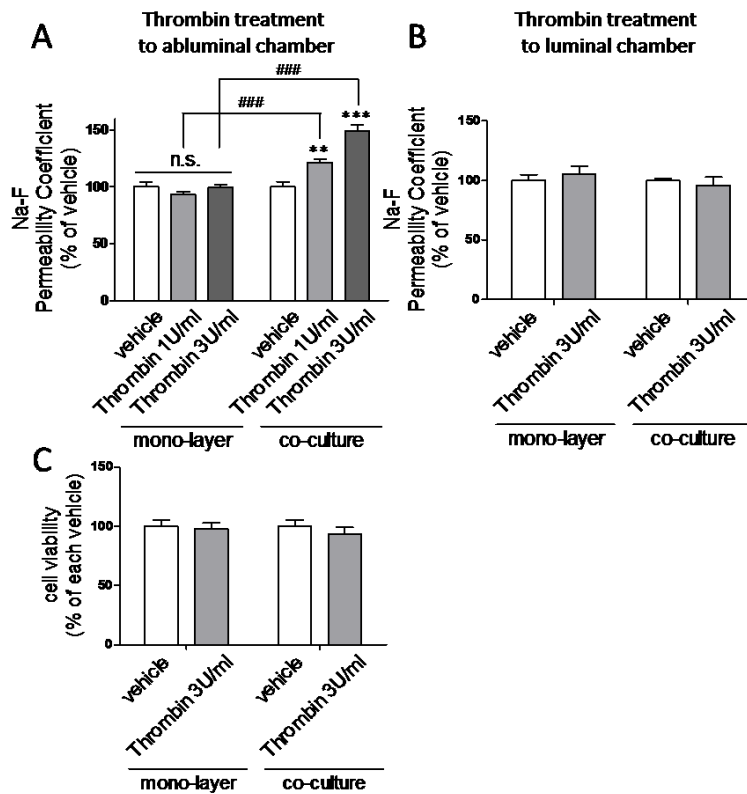


Figure 2. Effects of thrombin on brain endothelial barrier function in the absence or presence of pericytes. Two types of blood-brain barrier models, rat brain microvascular endothelial cell (RBEC) monolayers and RBEC/pericyte co-cultures, were treated by thrombin (1 or 3 U/mL) addition to abluminal (A) or luminal (B) chambers for 24 h. Barrier function was then evaluated by Na-F permeability. (C) Effect of thrombin (3 U/mL) added to abluminal chambers on viability of RBECs in RBEC monolayers and RBEC/pericyte co-cultures. Cell viability of RBECs was assessed using a WST-8 assay. Data are expressed as a percentage of the vehicle control group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. vehicle, ### $p < 0.01$ , #### $p < 0.001$  vs. each thrombin-treated group (A:  $n = 14-16$ , B:  $n = 8-12$ , C:  $n = 7$ , D:  $n = 8$ ).

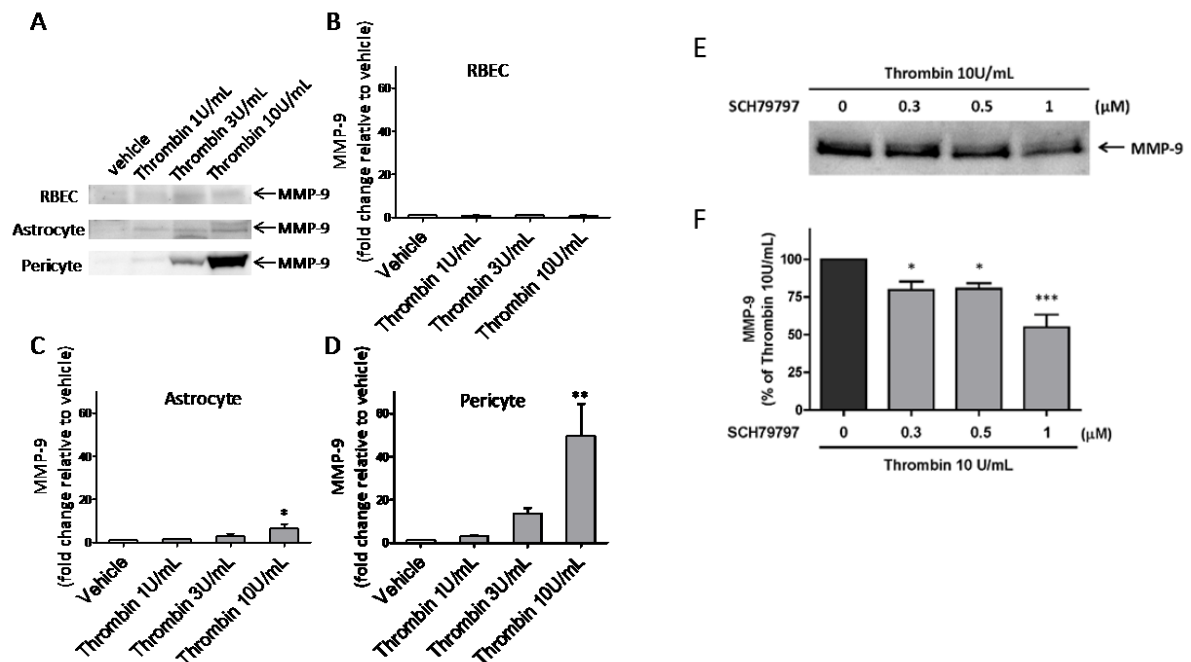


Figure 3. Comparison of thrombin-induced MMP-9 release among three cell types constituting the BBB. (A) Representative immunoblots showing MMP-9 in the culture supernatants of the BBB cells treated with thrombin (1, 3, and 10 U/mL) for 24 h (top: RBEC, middle: astrocyte, and bottom: pericyte). (B, C, and D) Quantitative analysis of western blots with densitometer for RBEC (B), astrocyte (C), and pericyte (D). (E) Representative immunoblots of MMP-9 in culture supernatants of the thrombin-treated brain pericytes. Pericytes were treated with thrombin (10 U/mL) in the absence or presence of SCH79797 (0, 0.3, 0.5, and 1 μM) for 24 h. (F) Quantitative analysis of western blots with densitometer. Values are shown as means  $\pm$  SEM ( $n = 3-10$  wells). Values are shown as means  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$  wells). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significant differences from vehicle (B, C, D) or Thrombin 10 U/mL (F).

## 2-3 脳ペリサイトのトロンビン誘発性 MMP-9 産生機構の解明

### 2-3-1 Protein kinase C (PKC) を介した脳ペリサイトのトロンビン誘発性 MMP-9 産生

トロンビン誘発性 MMP-9 産生は、PKC の選択的阻害剤である Go6976 及び Go6983 により濃度依存的に抑制された (Fig. 4A)。また、Go6976 は PKC  $\theta$  のリン酸化を、Go6983 は PKC  $\delta$  のリン酸化をそれぞれ特異的に抑制した (Fig. 4B, 4C)。

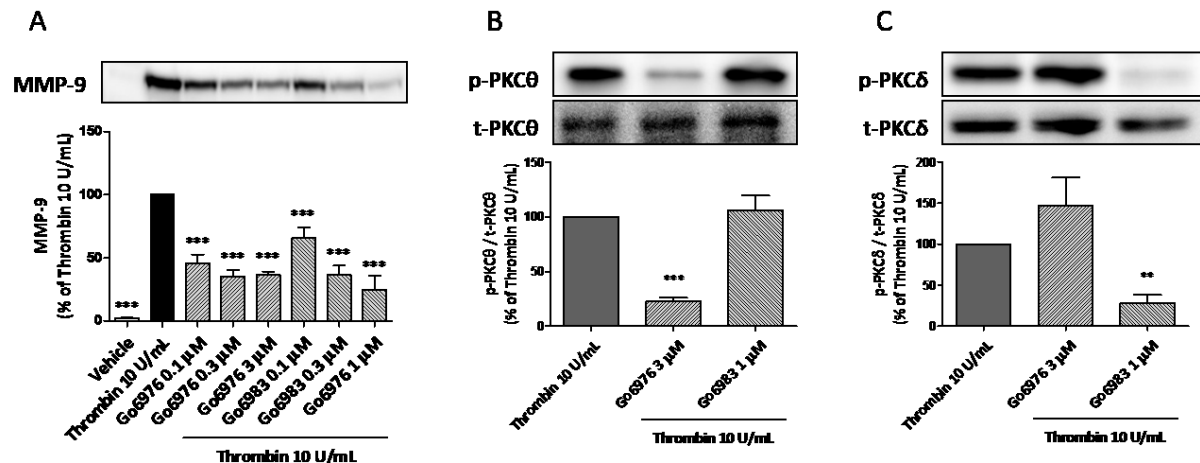


Figure 4. (A) PKC inhibitors-evoked inhibition of thrombin-induced MMP-9 release from brain pericytes. Representative immunoblots (top) and bar graph (bottom) show thrombin (10 U/mL)-induced MMP-9 release from brain pericytes in the absence or presence of Go6976 (0.1, 0.3, and 3  $\mu$ M) or Go6983 (0.1, 0.3, and 1  $\mu$ M) for 24 h. Values are shown as percentage of thrombin-induced MMP-9 release without PKC inhibitors (% of thrombin 10U/mL). (B, C) PKC inhibitors-induced two distinct inhibitions of thrombin-induced PKC $\theta$  and PKC $\delta$  phosphorylation in brain pericytes. Representative immunoblots of total and phosphorylated PKC $\theta$  (A, top) and PKC $\delta$  (B, top) in cell lysates of pericytes treated with thrombin (10 U/mL) in the absence or presence of Go6976 (3  $\mu$ M) or Go6983 (1  $\mu$ M) for 5 min. In the bottom of each panel, values are shown as percentage of relative ratio of phosphorylated PKC to total PKC in thrombin-treated pericytes (% of thrombin 10U/mL). Bars represent mean  $\pm$  SEM (n = 3–6 wells each (A), n = 4–5 wells each (B, C)). \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. thrombin (10 U/mL).

### 2-3-2 PKC $\theta$ -Akt、PKC $\delta$ -ERK1/2 経路による脳ペリサイトのトロンビン誘発性 MMP-9 産生

トロンビン誘発性 MMP-9 産生は、Akt 阻害剤である LY294002 及び ERK1/2 阻害剤である U0126 により抑制された (Fig. 5A)。また、Go6976 は Akt のリン酸化を、Go6983 は ERK1/2 のリン酸化をそれぞれ特異的に抑制した (Fig. 5B, 5C)。

### 2-3-3 PAR1 を介したトロンビンによる脳ペリサイトの PKC $\theta$ 及び PKC $\delta$ のリン酸化

脳ペリサイトに PAR1 活性化 PAR4 活性化ペプチド及び PAR1 活性化ペプチドと PAR4 活性化ペプチドのミックスを処理した。PAR1 活性化ペプチドにより、PKC  $\theta$  及び PKC  $\delta$  のリン酸化がみられたが、PAR4 活性化ペプチド及び PAR1 活性化ペプチドと PAR4 活性化ペプチドのミックスでは PKC  $\theta$  及び PKC  $\delta$  のリン酸化はみられなかった (Fig. 6A, 6B)。

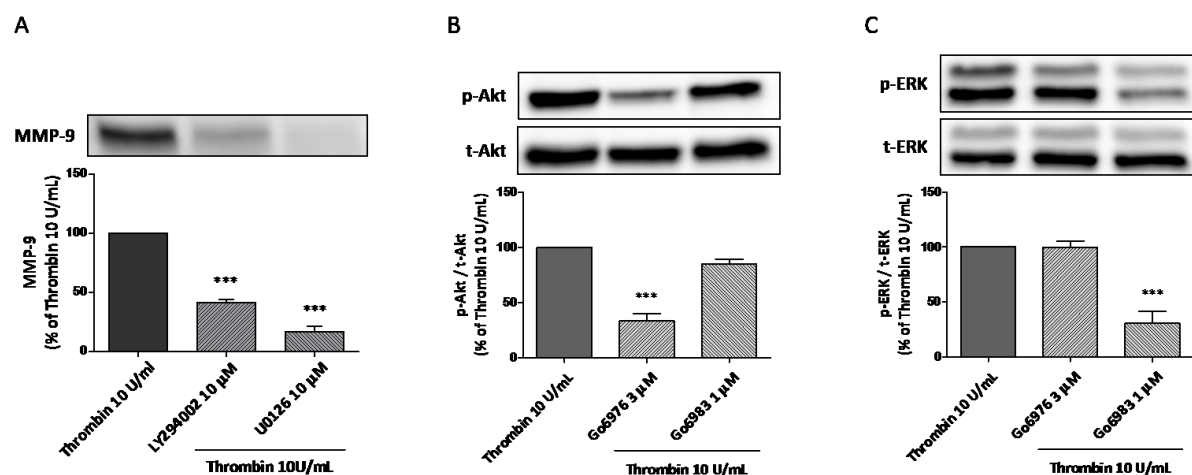


Figure 5. Akt- and ERK1/2-mediated MMP-9 release and PKC isoform-dependent Akt and ERK1/2 phosphorylation in thrombin-stimulated pericytes. (A) Representative immunoblots (top) and bar graph (bottom) show thrombin (10 U/mL)-induced MMP-9 release from brain pericytes in the absence or presence of LY294002 (10  $\mu$ M) or U0126 (10  $\mu$ M) for 24 h. Values are shown as percentage of thrombin-induced MMP-9 release from vehicle-treated pericytes (% of thrombin 10U/mL). Bars represent mean  $\pm$  SEM (n = 3–5 wells each). \*\*\*p < 0.001 vs. thrombin (10 U/mL). (B, C) Representative immunoblots (top) and bar graph (bottom) show total and phosphorylated Akt (B) and ERK1/2 (C) in cell lysates of pericytes treated with thrombin (10 U/mL) in the absence or presence of Go6976 (3  $\mu$ M) for 1 h or Go6983 (1  $\mu$ M) for 5 min. Values are shown as percentage of relative ratio of phosphorylated Akt and ERK to total Akt and ERK, respectively, in thrombin-treated pericytes (% of thrombin 10U/mL). Bars indicate mean  $\pm$  SEM (n = 3 wells each). \*\*\*p < 0.001 vs. thrombin 10 U/mL.

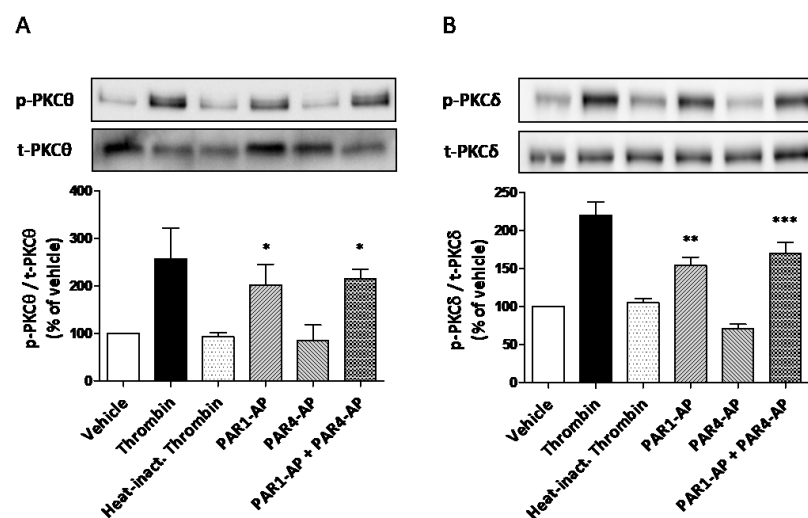


Figure 6. PAR1 and PAR4 expression in pericytes and PKC0 and PKC $\delta$  phosphorylation in PAR activators-stimulated pericytes. (A, B) Representative immunoblots (top) and bar graph (bottom) show total and phosphorylated PKC0 (A) and PKC $\delta$  (B) in cell lysates of brain pericytes treated with thrombin (10 U/mL), heat-inactivated thrombin, PAR1-AP, PAR4-AP, and mixture of PAR1-AP and PAR4-AP. Values are shown as percentage of relative ratio of phosphorylated PKC0 and PKC $\delta$  to total PKC0 and PKC $\delta$  in vehicle-treated pericytes (% of vehicle), respectively. Bars indicate mean  $\pm$  SEM (n = 3–4 wells each). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. vehicle.

#### 2-3-4 脳ペリサイトの PAR1 を介した経内皮細胞透過性亢進

脳ペリサイトに高発現するトロンビン受容体のサブタイプである PAR1 及び PAR4 の、トロンビン誘発性経内皮細胞透過性亢進への関与について、in vitro BBB モデルを用いて検討した。In vitro BBB モデルの abluminal chamber に PAR1 活性化ペプチドを負荷したところ、co-culture でのみ経内皮細胞透過性が亢進し、monolayer では経内皮細胞透過性の亢進はみられなかった (Fig. 7A)。また、PAR4 活性化ペプチドの abluminal chamber への負荷においては、monolayer、co-culture とともに経内皮細胞透過性の亢進はみられなかった (Fig. 7B)。

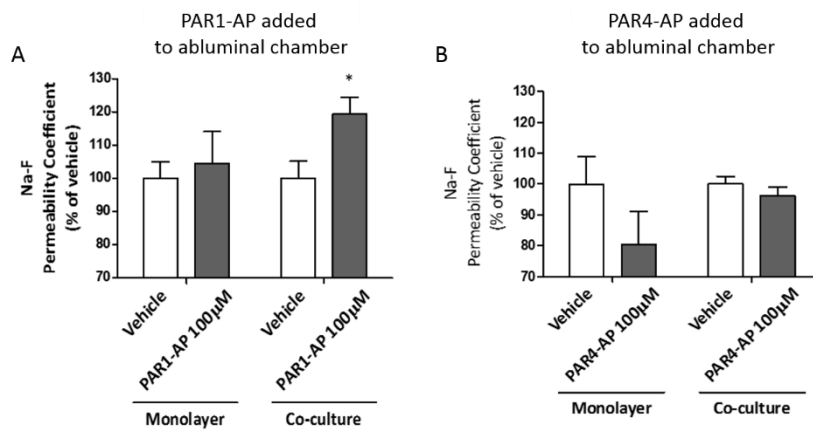
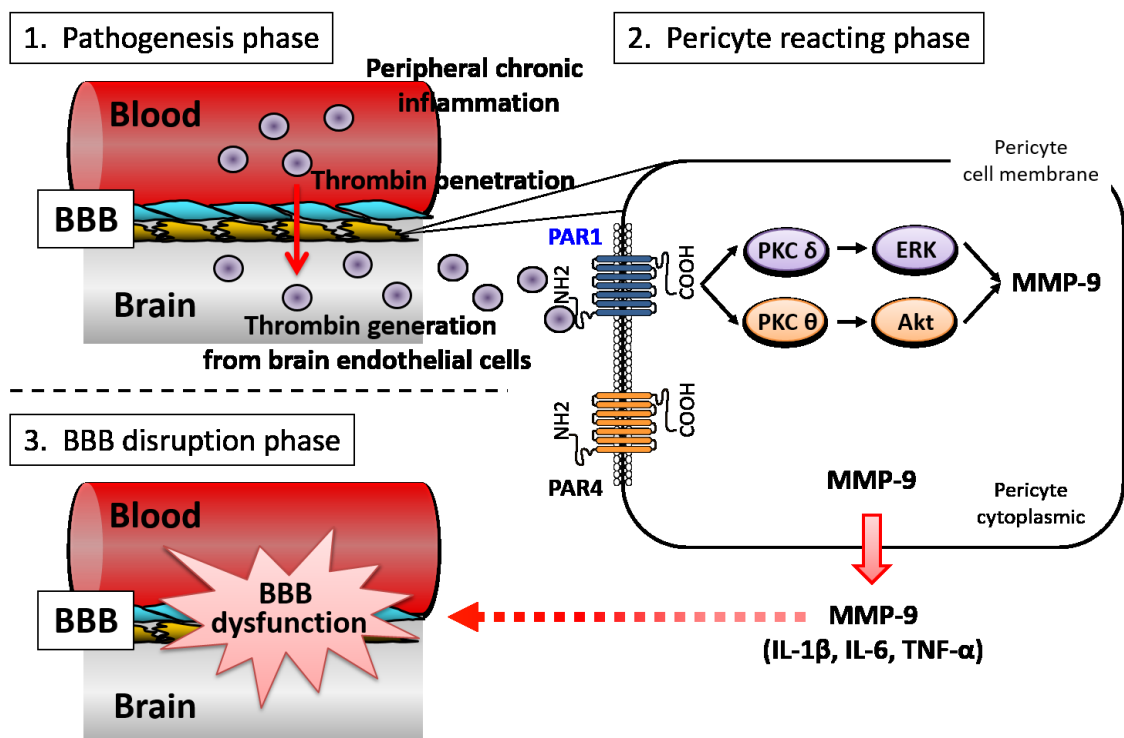


Figure 7. Effects of PAR activators on brain endothelial permeability in the absence or presence of pericytes. (A, B) Effects of PAR1-AP, and PAR4-AP on brain endothelial barrier function in the absence or presence of pericytes. PAR1-AP (100  $\mu$ M) (A), or PAR4-AP (100  $\mu$ M) (B) were added into the abluminal chambers of RBEC monolayers and RBEC/pericyte co-cultures. Following a 24-h exposure, brain endothelial barrier function was evaluated by Na-F permeability. Values are shown as percentage of each vehicle. Bars indicate mean  $\pm$  SEM ((A) n = 8 wells each, (B) n = 7 wells each). \*p < 0.05 vs. each vehicle.

### 【総括】

本研究で得られた知見から、末梢性慢性炎症病態時の中枢神経障害の発症機構について、以下の1)～3)の仮説が提案される。1) 末梢炎症病態時に、末梢血中からの流入や脳血管内皮細胞からの直接的産生により、トロンビンが脳内に増加する。2) 増加した脳内トロンビンへの長期的な暴露により脳ペリサイトの病変が生じ、PAR1-PKC  $\theta$ -Akt 経路及び PAR1-PKC  $\delta$ -ERK 経路を介して MMP-9 やその他の炎症性物質が産生される。3) MMP-9 やその他の炎症性物質により、BBB の機能障害が生じる。以上の1)～3)の段階を経ることで、その結果として末梢性慢性炎症が脳内へ伝播し脳内炎症が形成され、中枢神経障害が生じる可能性が示唆される。

本研究は、トロンビン反応性脳ペリサイトが、脳内炎症の病態形成に重要な役割を担うと同時に、BBB 機能障害を伴う中枢変性疾患の有効な新規治療標的となる可能性を提案するものである。



## 審査の結果の要旨

血液脳関門 (blood-brain barrier:BBB) は、脳血管内皮細胞、アストロサイト及び脳ペリサイトによって構成される高度に分化した機構である。BBB は、健常状態では強固かつ密着した構造体であるが、脳炎症時には密着結合 (tight junction: TJ) 蛋白質が障害され脆弱となる。脳炎症は、脳卒中やアルツハイマー病、パーキンソン病やさらには末梢炎症病態である糖尿病時の合併症としても認められる。これらの病態では BBB 障害により、通常末梢からの流入を制限されている生体内物質や炎症性物質、炎症性細胞などが流入し、中枢神経が障害される。脳卒中やアルツハイマー病、糖尿病時の血液中に増加する因子の一つであるトロンビン<sup>1</sup>は、凝固因子としての作用に加え、近年においては種々の炎症病態に関与する炎症性メディエーターとしても知られている。しかし、トロンビンの脳ペリサイトに対する作用については未だ報告がない。本学位論文は、トロンビン反応性脳ペリサイトの脳炎症および BBB 障害への関与とその機構について明らかにすることを企図したものである。

第1章では、ラット *in vitro* BBB モデルの作製に関する基礎研究を行い、本モデルの有用性について検討された。幼若期及び若年期ラットの脳から単離・作製した *in vitro* BBB モデルは、それぞれに対応する BBB の *in vivo* 特性を十分反映するものであった。幼若期の簡便型 *in vitro* モデルでメトホルミンは BBB 密着結合能を強化することが明らかにされた。この基礎研究で確立した方法を用いて以下の脳ペリサイト研究の遂行が可能となった点で意義がある。

第2章では、トロンビン処理による脳ペリサイトの MMP-9 産生能について BBB 構成細胞である脳血管内皮細胞、アストロサイトのそれと比較された。脳ペリサイトは著しい MMP-9 産生・放出能を示した。また、この MMP-9 産生・放出は、PAR1 阻害剤により一部抑制された。脳ペリサイトが BBB で著しく高いトロンビン誘発性 MMP-9 産生・放出能を持つことを明らかにした点が評価された。

第3章では、トロンビン反応性脳ペリサイトの MMP-9 産生機構について検討された。トロンビン誘発性 MMP-9 産生は、PKC 選択的阻害剤 Go6976 及び Go6983 により濃度依存的に抑制された。また、Go6983 は PKC  $\delta$  のリン酸化を、Go6976 は PKC  $\theta$  のリン酸化をそれぞれ特異的に抑制した。トロンビン誘発性 MMP-9 産生は、Akt 阻害剤及び ERK1/2 阻害剤により抑制された。また、Go6983 は ERK1/2 のリン酸化を、Go6976 は Akt のリン酸化を、それぞれ特異的に抑制した。脳ペリサイトのトロンビン誘発性 MMP-9 産生・放出を担う細胞内機構には、PAR-1-PKC  $\delta$ -ERK1/2 経路と PAR-1-PKC  $\theta$ -Akt 経路の2経路が存在することを明らかにした点が高く評価された。

第4章では、肥満・耐糖能異常モデルマウスの脳内トロンビン量の変化とトロンビン反応性脳ペリサイトの BBB 障害に対する作用について検討された。High fat diet (HFD) を2週間負荷したモデルマウスでは血漿中でのみトロンビン濃度が有意に上昇した。一方、HFD の8週間処理マウスでは、脳及び血漿中トロンビン濃度が有意に上昇した。そこで、*in vitro* BBB モデルを用いてトロンビン処理した脳ペリサイトによる BBB バリア機能の影響について検討された。トロンビンを abluminal side に負荷すると、co-culture でのみ Na-F 透過性が濃度依存的に亢進した。monolayer、co-culture とともに、脳血管内皮細胞の細胞障害は認められなかった。さらに、トロンビン処理した脳ペリサイトが脳血管内皮

細胞の TJ 蛋白質に与える影響について検討された。co-culture のトロンビン処理により ZO-1、occludin の発現量が優位に減少した。肥満・耐糖能異常モデルマウスでは脳内トロンビンが増加すること及びトロンビン反応性脳ペリサイトは脳血管内皮細胞の TJ 蛋白質発現量を減少させ BBB 透過性を亢進させることを明らかにした点が評価された。

以上、脳ペリサイトは、他の BBB 構成細胞である脳血管内皮細胞、アストロサイトと比較して、著しく高いトロンビン誘発性 MMP-9 産生・放出能を持つことが明らかにされた。この過程を担う細胞内機構には、PAR-1-PKC  $\delta$ -ERK1/2 経路と PAR-1-PKC  $\theta$ -Akt 経路の 2 経路が存在することも判った。また、肥満・耐糖能異常モデルマウスでは脳内トロンビン量が増加すること、さらに、トロンビン反応性脳ペリサイトは、脳血管内皮細胞の TJ 蛋白質発現量を減少させ BBB 透過性を亢進させることも明らかとなった。本学位論文は、糖尿病などの炎症病態下における BBB 障害にトロンビン反応性脳ペリサイトが関与する可能性を提示した点で意義深く、論文博士の学位論文として適格かつ高質であると判定した。また、公聴会審査における申請者の質疑応答は、学位を授与するに応分の能力を証明するものと結論した。